

09/987,025

#5



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <b>C12N 15/00</b></p>	<b>A2</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/65036</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. November 2000 (02.11.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP00/03465</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 17. April 2000 (17.04.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 199 18 949.8      27. April 1999 (27.04.99)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AK- TIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LICHTENTHALER, Hartmut [DE/DE]; Im Kennental 17, D-76227 Karlsruhe (DE). SCHWENDER, Jörg [DE/DE]; Seltenbachstrasse 5, D-76327 Pfalzthal (DE). REINDL, Andreas [DE/DE]; Albertine-Scherer-Strasse 21, D-67134 Birkenheide (DE). HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</p>	
<p>(54) Title: OVEREXPRESSION OF A DNA SEQUENCE CODING FOR A 1-DESOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE REDUCTOISOMERASE IN PLANTS</p> <p>(54) Bezeichnung: ÜBEREXPRESSION EINER DNA-SEQUENZ CODIEREND FÜR EINE 1-DES- OXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHAT REDUKTOISOMERASE IN PFLANZEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for producing plants containing increased quantities of tocopherols, vitamin K, carotinoids, chlorophylls and polyterpenes by overexpression of a DXPRI gene.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen durch Überexpression eines DXPRI-Gens.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Überexpression einer DNA-Sequenz codierend für eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase in Pflanzen

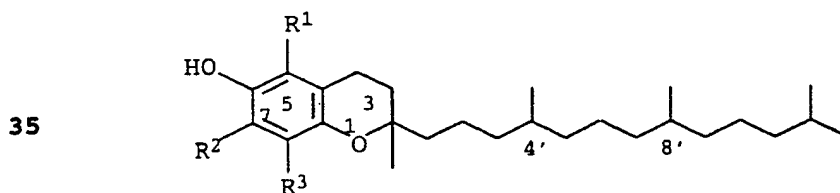
## 5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine DNA kodierend für ein Polypeptid mit 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXPRI)-Aktivität pflanzlichen Ursprungs. Zudem betrifft die Erfindung die

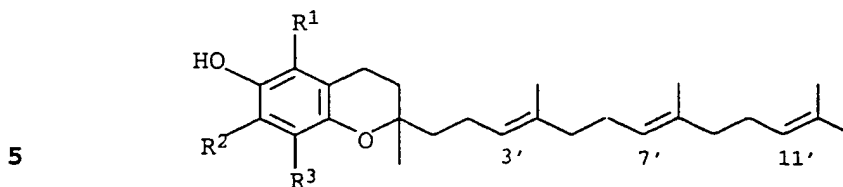
- 10 Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für ein Polypeptid mit DXPRI-Aktivität pflanzlichen Ursprungs zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Carotinoiden, Vitamin K, Chlorophyllen und Polyterpenen, speziell die Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenzen, einem Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Carotinoiden, Vitamin K, Chlorophyllen und Polyterpenen, sowie die derart hergestellte Pflanze selbst.

- Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bisher die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

- 25 Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a-d):



- 1a,  $\alpha$ -Tocopherol:  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 40 1b,  $\beta$ -Tocopherol [148-03-8]:  $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$   
 1c,  $\gamma$ -Tocopherol [54-28-4]:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 1d,  $\delta$ -Tocopherol [119-13-1]:  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$



- 2a,  $\alpha$ -Tocotrienol [1721-51-3]:  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 2b,  $\beta$ -Tocotrienol [490-23-3]:  $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$   
 10 2c,  $\gamma$ -Tocotrienol [14101-61-2]:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 2d,  $\delta$ -Tocotrienol [25612-59-3]:  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt  $\alpha$ -Tocopherol.

- 15 Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits beispielsweise der Tocopherol-Gehalt bzw. der Gehalt des gewünschten Stoffwechselendproduktes bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits  
 20 können nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen.  
 25 Auch wäre beispielsweise die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

- Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, beispielsweise  
 30 die für die Tocopherol Syntheseleistung kodierenden, essentiellen Biosynthesegene zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen,  
 35 identifiziert werden.

Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus  $\text{C}_5$ -Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z.B.

- 40 Carotinoide) bestehen aus C-Gerüsten, die ausschließlich auf Isopren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide (z.B. Chlorophylle, Tocopherole und Vitamin K) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit einem aromatischen Kern verbunden ist.
- 45 Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind 3 x Acetyl-CoA Einheiten, die über  $\beta$ -Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit ( $\text{C}_5$ ), dem Isopentenyl-

- pyrophosphat (IPP), umgewandelt werden. Kürzlich wurde durch in vivo Fütterungsexperimente mit  $C^{13}$  gezeigt, daß in verschiedenen Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschriftet wird (Abbildung 1). Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) vermittelten "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat umgewandelt
- 10 (Lange et al, 1998; Schwender et al, 1997; Arigoni et al, 1997; Lichtenthaler et al, 1997; Sprenger et al, 1997). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung durch die DXPRI in 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat und im weiteren zu IPP umgesetzt (Arigoni et al, 1997; Zeidler et al, 1998). Biochemische
- 15 Daten deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung, führt lediglich zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytoplasma, während die Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeeinflusst ist (Bach & Lichtenthaler, 1993). Der Mevalonat-unabhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären Prenyllipiden (Schwender et al, 1997; Arigoni et al, 1997).
- 25 IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen ( $C_{10}$ ) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum Sesquiterpen ( $C_{15}$ ) Farnesyl-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen
- 30 ( $C_{20}$ ) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der  $C_{40}$ -Vorläufer für Carotinoide.

- Bei gemischten Prenyllipiden ist die Isopren-Seitenkette verschiedener Länge mit Nicht-Isopren Ringen verbunden wie beispielsweise ein Porphyrin-Ring bei Chlorophyll a und b. Die Chlorophylle und Phylloquinone enthalten eine  $C_{20}$  Phytyl-Kette, in der nur die erste Isopren-Einheit eine Doppelbindung enthält. GGPP wird durch die Geranylgeranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase
- 40 (GGPPOR) zum Phytyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere Bildung von Tocopherolen.

- Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone,
- 45 deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homo-

- gentisinsäure überführt wird. Das Chorismat wird einerseits über Erythrose-4-Phosphat, 3'-Dehydrochinat, 3'-Dehydroshikimat, Shikimat, Shikimat-3-Phosphat und 5'-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat gebildet ( Abb. 1 ). Dabei werden Fruktose-6-Phosphat und Glyceraldehyd-3-Phosphat zu Xylulose-5-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat umgesetzt. Die oben beschriebene Homogentisinsäure wird anschließend an PPP gebunden, um den Vorläufer von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocoquinon, das 2-Methyl-6-phytylquinol, zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung  $\alpha$ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung  $\alpha$ -Tocopherol (Richter, Biochemie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).
- 15 In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Manipulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß directional beeinflussen kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen miteinander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Carotinoid-Mengen dieser transgenen Tomatenpflanzen gemessen werden (Fray und Grierson, Plant Mol.Biol.22(4),589-602(1993); Fray et al., Plant J., 8, 693-701(1995)). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym Phenylalanin-Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenylalanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (16): 7608-7612 (1994); Howles et al., Plant Physiol. 112. 1617-1624(1996)).
- 20 Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol-Gehaltes in Pflanzen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvate-dioxygenase (HPPD).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen.

- 40 Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXPRI)-Gens in den Pflanzen.
- 45 Um beispielsweise den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in die Tocopherol-Biosynthese zu verstärken, wurde die Bildung von 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-P als essentielltem Ausgangssubstrat

für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Pflanzen die Aktivität der DXPRI durch Überexpression des DXPRI-Gens aus *Arabidopsis thaliana* erhöht. Dies kann prinzipiell auch durch Expression homologer oder heterologer DXPRI-Gene erreicht werden. Eine Nukleotidsequenz codierend für eine DXPRI wurde aus *E.coli* beschrieben (Accession Nummer AB 013300; Kuzuyama et al., 1998; Takahashi et al., 1998).

- In Beispiel 1 wird erstmals ein pflanzliches DXPRI-Gen (Abb. 2, SEQ-ID No. 1) aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben und in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten wird der DXPRI-Nukleotidsequenz aus *Arabidopsis thaliana* eine Transitsignalsequenz (Abb. 3, Abb. 4) vorangestellt. Fragment A (529 bp) in Abbildung 4 beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment E beinhaltet das Gen der DXPRI. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DXPRI-Gen codiert, das mit SEQ-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.
- Das durch die zusätzliche Expression des DXPRI-Gens nun vermehrt zur Verfügung stehende 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-P wird weiter in Richtung Tocopherole, Carotinoide, Vitamin K, Chlorophylle und Polyterpene umgesetzt.
- Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DXPRI-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen wurden Tabak und Raps eingesetzt.
- Antisensekonstrukte sowie homologe bzw. heterologe pflanzliche DXPRI-Gene wurden unabhängig voneinander in Pflanzen transformiert (Abb. 5). Fragment A (529 bp) in Abbildung 5 beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase (Abbildung 3). Fragment E beinhaltet das Gen der DXPRI in Antisense-Orientierung. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Messungen an DXPRI-Antisensepflanzen ergaben bezüglich des Gehaltes an Tocopherolen und Carotinoiden eine drastische Abnahme. Dies belegt den direkten Einfluß der

plastidären pflanzlichen DXPRI auf die Synthese von Carotinoiden und Tocopherolen.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenz  
 5 SEQ-ID No. 1 aus *Arabidopsis thaliana*, die für eine DXPRI oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Carotinoiden, Vitamin K, Chlorophyllen und Polyterpenen. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion  
 10 in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DXPRI kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherolen, Carotinoiden, Vitamin K, Chlorophyllen und Polyterpenen verleihen.

15 Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende  
 20 der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DXPRI-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle  
 25 Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind  
 30 Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et  
 35 al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 6 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin  
 40 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- 45 - PNOS: Nopalinsynthase-Promotor



- außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder  
5 Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Fränck et al., Cell 21 (1980),  
10 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

15 Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DXPRI-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward  
20 et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch  
25 Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen  
30 beispielsweise die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989),  
35 2445 - 245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen expri-  
40 miert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und  
45 Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

- Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DXPRI-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DXPRI-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transit-
- 5 peptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. En-
- 10 quist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.
- 15 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev.
- 20 Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792).
- 25 Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DXPRI-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DXPRI-Gens
- 30 in die Chloroplasten vom DXPRI-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären DXPRI oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet
- 35 ist.

Besonders bevorzugt sind DNA-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Kartoffel in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem

40 ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC

45 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA

ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCTCG

TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGGA  
TCC\_BamHI

pTP10

5

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGTCG

10 GATCC\_BamHI

pTP11

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
15 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGGG  
ATCC\_BamHI

20 Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DXPRI kann  
synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine  
Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen ent-  
halten, sowie aus verschiedenen heterologen DXPRI-Genabschnitten  
verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthe-  
25 tische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen  
bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können  
aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden,  
die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert wer-  
den. Bei der Präparation einer Expressionskassette können ver-  
30 schiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Se-  
quenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Rich-  
tung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet  
ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an  
die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

35

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regio-  
nen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker,  
der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion die-  
ser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker  
40 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktions-  
stellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatori-  
schen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger  
als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ  
bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze  
45 sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkrip-  
tionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DXPRI-  
Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination.

Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

- Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

- Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

- Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

- Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

- Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DXPRI-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte *Agrobakterien* können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterien*lösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch *Agrobakterien* ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von

S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines DXPRI-Gens enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DXPRI kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzlich funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Gehaltes an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung des Gehaltes an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyll und Polyterpenen eingesetzt werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen

Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplasten-transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation 5 trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic 10 Press (1993), 128 - 143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205 - 225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 15 12 (1984), 8711).

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, 20 Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. 25 Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DXPRI-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der 30 hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere 35 auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine DXPRI kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise 40 auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der DXPRI-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnitt- 45 stellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

- 5 Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des DXPRI-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rücküber-
- 10 setzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die DXPRI-Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spe-
- 15 zifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

- Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu
- 20 nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein DXPRI-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren
- 25 Hilfe ein Nachweis auf DXPRI-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das DXPRI-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.
- 30 Erhöhung des Gehaltes an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen, Carotinoiden und Polyterpenen bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DXPRI-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gen-
- 35 technisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

- Der Biosyntheseort von Tocopherolen beispielsweise ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression
- 40 des DXPRI-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen DXPRI-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

- 5 Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DXPRI-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DXPRI-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen ge-  
10 stet werden.

- Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie  
15 transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß-  
20 und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

- 25 Da es sich bei diesem Biosyntheseweg um einen ausschließlich chloroplastidär-lokalisierten Stoffwechselweg handelt, bietet er optimale Targetenzyme für die Entwicklung von Inhibitoren. Da sich nach heutigem Stand der Technik kein mit der *Arabidopsis thaliana* DXPRI identisches oder ähnliches Enzym in anderen höhe-  
30 ren Organismen befindet, ist davon auszugehen, daß Inhibitoren sehr spezifisch auf Pflanzen wirken sollten. Der Wirkort eines Inhibitors, Fosmidomycin (3-(N-formyl-N-hydroxyamino)-propylphosphonsäure; Fujisawa Pharmaceutical Co.) konnte als DXPRI identifiziert werden. Im biochemischen Assay findet man eine ef-  
35 fektive Hemmung der enzymatischen Aktivität (Abb. 7). Folgende Abkürzungen wurden in Abb. 7 verwendet: DOX = 1-Deoxy-D-xylulose, ME = Methylerythritol. Die gleiche Wirkung findet man in einem Pflanzenassay, in dem Gerstenkeimlinge nach Fosmidomycinwirkung auf ihren Chlorophyll- und Carotinoidgehalt untersucht werden.  
40 Beide Substanzen, die sich aus Vorläufern des Isoprenoidstoffwechsels ableiten, sind in ihren Mengen stark erniedrigt (Abb. 8).

- Durch Überexpression der für eine DXPRI kodierenden Gensequenz  
45 SEQ-ID NO. 1 bzw. SEQ-ID No. 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DXPRI erreicht



werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 5
- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- 10
- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DXPRI durch verstärkte Expression der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA Sequenzen.
- 15
- Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen, Carotinoiden und Polyterpenen durch Expression einer DXPRI DNA-Sequenz in Pflanzen.
- 20

25 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

#### Allgemeine Klonierungsverfahren

- 30 Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von
- 35 Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.

- Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kan) wurde von Deblaere et al. in Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777 beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere
- 45 geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 - 119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitro-

gen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221 - 230) benutzt werden.

## 5 Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

### Beispiel 1

#### Klonierung der *Arabidopsis thaliana* DXPRI

15

Ausgehend von der in der Genbank abgelegten Sequenz der *E. coli* DXPRI konnten in Gendatenbanken andere DXPRI-homologe bakterielle Proteinsequenzen identifiziert werden. Ein Vergleich der je lediglich 400 Aminosäuren langen Proteinsequenzen zeigte mehrere konservierte Aminosäure-Sequenzmotive. Ein solches Motif zeigte Homologien mit einer abgelegten genomischen *Arabidopsis*-Sequenz (Accession Nummer AB009053).

Da die bakteriellen DXPRI-Sequenzen nahe am vermeintlichen N-Terminus minus eine konservierte Aminosäuresequenz aufweisen, wurde der Beginn eines funktionellen Teils der *Arabidopsis*-DXPRI-Sequenz sehr genau in abgelegten genomischen Sequenzen lokalisiert. Das C-terminale Ende der Sequenz (Stop-Codon) konnte durch einen Vergleich mit dem EST-Klon (Accession Nummer AA586087) gefunden werden. Es wurde ein 1215 bp großes Fragment der DXPRI kloniert, welches durch heterologe Expression auf enzymatische Funktionalität untersucht wurde.

Es wurde mRNA aus *Arabidopsis thaliana* (var. Columbia) isoliert und cDNA (nach Herstellerangaben Stratagene) erzeugt. Es wurden aus den Sequenzen AB009053 und AA586087 PCR-Primer abgeleitet, mit welchen aus der hergestellten cDNA ein 1215 bp großes DNA-Fragment amplifiziert wurde. Der Primer ATRv3 besitzt eine BamHI-Schnittstelle und ist so gewählt, daß nach Restriktionsverdau und Ligation in pBluescript oder pET5b (Expressionsplasmid; Promega) die kodierende Sequenz ab der N-terminalen ersten konservierten Sequenz im Leserahmen der Proteintranslation einligiert wird.

Atrv3 5' TCAGGATCCGGCGCCTCGTCAATCT 3'  
 45 Atrr1 5' GACGAATTCCTTCTCCAACAACCAATTCT 3'

Die Primer Atrv3 und Atrr1 enthielten eine BamHI- bzw. eine EcoRI-Schnittstelle (jeweils unterstrichen). Das PCR-Produkt (Atrv3/Atrr1) wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und mit BamHI und EcoRI verdaut. Zur Ligation wurden  
5 der Vektor pET5b ebenfalls mit BamHI und EcoRI geschnitten. Die Ligationsprodukte wurden in *E. coli* XL1Blue (Stratagene) transformiert.

Das Plasmid pET5bAtr enthält ein Genfragment kodierend für DXPRI  
10 aus *Arabidopsis thaliana*. Dessen Sequenz wurde bestimmt (Abbildung 2, SEQ-ID No.1). Die aus dem Plasmid pET5bAtr erhaltene Nucleotid-Sequenz läßt sich mit den Sequenzen AB009053 und AA586087 abgleichen. Demnach enthält die genomische Sequenz AB009053 10 Introns.

## 15 Beispiel 2

Klonierung der *Arabidopsis thaliana* DXPRI in den Expressionsvektor pET5bAtr und Nachweis der enzymatischen Aktivität.

20 Der Expressionsvektor pET5b (Promega) ist ein Expressionsvektor für die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*. Das Plasmid ist abgeleitet von pBR322 und trägt für die Expression einen Bakteriophage T7-Promotor. Zur Expression wird das Plasmid in einem  
25 *E. coli*-Stamm vermehrt, welcher ein induzierbares Gen für die T7-Polymerase trägt (z.B. JM109(DE3); Promega). Die Expression des rekombinanten Proteines wird aktiviert über die Induktion der T7-Polymerase.

30 pET5bAtr codiert für ein Fusionsprotein mit 420 Aminosäuren Länge. Die Aminosäuren 1 bis 14 stammen aus pET5b (Fusionspeptid; Abbildung 3). Die Aminosäuren 15 bis 420 stammen aus dem klonierten DXPRI-Fragment (Abb. 2). In Abb. 3 ist die DNA-Sequenz für das Fusionspeptid unterstrichen. Aus der gesamten Sequenz läßt  
35 sich ein Molekulargewicht von 45,6 KDa für das Protein berechnen.

Der transgene Stamm wurde im Anzuchtmedium "2x YT" (pro 1 l: Bacto-Trypton 16 g, Hefe-Extrakt 10 g, NaCl 5g) inkubiert. Die Anzucht erfolgte bei 37°C bis zu einer OD<sub>560 nm</sub> von 0,6. Nach Zugabe von IPTG (1mM) erfolgte das Wachstum weitere 10 min bei 37°C,  
40 dann weitere 4h bei 22° bis zur Ernte. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 1% NaCl gewaschen. Nach Aufbruch der Zellen (50 bis 500 ml Zellkultur (OD<sub>560 nm</sub> von 1,0) mittels French Press wurde ein Protein-Rohextrakt für Enzymtests verwendet (in 4 ml Extraktionspuffer (Tris/HCl (pH 7,5) 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 2 mM, PMSF  
45

0,1 mM). Zur Aufbewahrung wurden die Rohextrakte mit 20% Glycerin bei -20°C eingefroren.

- Für den Enzymtest wurden 15 µl (auf 1 bis 7 mg Protein/ml verdünnt) Proteinextrakt mit MnCl<sub>2</sub> (1 mM), NaF (5 mM), NADPH<sub>2</sub> (0,5 mM) und <sup>14</sup>C-1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (0,25 mM, 3 KBq) für 30 min. bei 30°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte bei 100°C (30 sec.) durch Zugabe von CaCl<sub>2</sub> (auf 100 mM) und alkalischer Phosphatase (0.5 units). Das Dephosphorylieren des Produktes erfolgte für 2h bei 30°C. Die Detektion erfolgte durch die dünnschichtchromatographische Auftrennung des Produktes auf Kieselgel 60 (Merck) mit Aceton/Ethylacetat/Wasser (50+50+2) mit anschließender Auswertung via Instant Imager. Man erhält 1-Deoxy-D-xylulose (DOX; R<sub>f</sub> 0,4) und Methylerythritol (ME; R<sub>f</sub> 0,2). Abbildung 9 gibt die dünnschichtchromatographische, autoradiographische Auswertung nach heterologer Expression der DXPRI aus *Arabidopsis thaliana* in *E. coli* und Enzymassay bei Einsatz verschiedener Gesamt-Proteinkonzentrationen (µg Protein/µl) wieder. K = Kontrolle *E. coli* JM 109 (DE3) mit Plasmid pET5b ohne DXPRI.
- 20 Proben: *E. coli* JM 109 (DE3) mit Plasmid pET5b mit DXPRI aus *Arabidopsis thaliana*. Die Bildung von ME kann effektiv inhibiert werden durch Verwendung von Fosmidomycin in verschiedenen Konzentrationen. Dies zeigt den "mode-of-action" von Fosmidomycin als Inhibitor der DXPRI.

25

### Beispiel 3

Herstellung des Substrats 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DOXP) für den Enzymassay

30

Für die Herstellung von DOXP wurde aus *Chlamydomonas reinhardtii* klonierte DOXS verwendet (pET5b, *E. coli* JM109(DE3)).

- Enzymextrakte aus mit IPTG induzierten *E. coli*-Zellen wurde mit [3-<sup>14</sup>C]-Pyruvat und DL-GAP inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt nach 30 min. durch Hitzedenaturierung der Proteine. Nach Abzentrifugieren wurde der Umsatz des radioaktiven Pyruvats mittels DC/Autoradiographie überprüft und der Überstand als Substrat für die Reduktoisomerase verwendet.

40

DOXP als Reaktionsprodukt wurde nach folgenden Kriterien identifiziert:

45

1. Es entsteht ein radioaktives Produkt, welches nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase sich in DC-Trennungen weniger polar verhält. Dies legt nahe, daß ein phosphoryliertes Produkt aus  $^{14}\text{C}$ -Pyruvat und GAP gebildet wurde.
- 5 2. Das dephosphorylierte Produkt läuft in der DC (Kieselgel, Aceton/Ethylacetat/Wasser-50/50/2) gleich mit einer synthetischen Probe von 1-Desoxy-D-Xylulose.
- 10 Der Reaktionsansatz enthielt Proteinextrakt (20  $\mu\text{l}$ /100 $\mu\text{l}$  Ansatz), Tris/HCl (pH 7,5) 100 mM, DTT 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, Na-EDTA 500  $\mu\text{M}$ , PMSF 100  $\mu\text{M}$ , NaF 5 mM, TPP 1 mM, Na-Pyruvat 1 mM, Na-[2- $^{14}\text{C}$ ] Pyruvat 20 KBq/100  $\mu\text{l}$  und DL-Glycerinaldehyd-3-Phosphat 3,75 mM.

15

## Beispiel 4

Klonierung der *Arabidopsis thaliana* DXPRI in den Pflanzentransformationsvektor pBin19AR-TP

20

Zur Klonierung der DXPRI in einen binären Vektor wurden die Primer so gewählt, daß nach Restriktionsverdau und Ligation in pBin19AR-TP (Promega) die kodierende Sequenz ab der N-terminalen ersten konservierten Sequenz im Leserahmen der Proteintranslation

25 einligiert wird.

AtrvpBin1	5' TCAGGATCCGGCGCCTCGTCAATCT 3'
AtrrpBin2	5' GACCCCGGGTCTTCCAACAACCAATTCT 3'

- 30 Die Primer AtrvpBin1 und AtrrpBin2 enthielten eine BamHI- bzw. eine SmaI-Schnittstelle (jeweils unterstrichen). Das PCR-Produkt (AtrvpBin1/AtrrpBin2) wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und mit BamHI und SmaI verdaut. Zur Ligation wurden der Vektor pBin19AR-TP ebenfalls mit BamHI und SmaI ge-
- 35 schnitten, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV 35S Promotor enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Das Konstrukt ist in Abbildung 4 dargestellt.

40 Beispiel 5

Herstellung von DXPRI-Antisense-Konstrukten

Zur Klonierung der DXPRI in einen binären Vektor in Antisense-

45 Orientierung wurden folgende Primer gewählt.

AtrvpBin3	5' TCACCCCGGGGGCGCCTCGTCAATCT 3'
-----------	----------------------------------

AtrrpBin4

5' GACGGATCCTTCTTCCAACAACCAATTCT 3'

- Die Primer AtrvpBin3 und AtrrpBin4 enthielten eine SmaI- bzw. eine BamHI- Schnittstelle (jeweils unterstrichen). Das PCR-
- 5 Produkt (AtrvpBin3/AtrrpBin4) wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und mit SmaI und BamHI verdaut. Zur Ligation wurden der Vektor pBin19AR-TP ebenfalls mit SmaI und BamHI geschnitten, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV 35S Promotor enthält. Das
- 10 Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Das Konstrukt ist in Abbildung 5 dargestellt.

- Tabakpflanzen mit reduzierter DXPRI-Aktivität wurden einer Selbstung unterzogen und der erhaltene Samen geerntet. Zur weiteren
- 15 Analyse der Pflanzen wurde Samen aus der F1-Generation verwendet.

- Alle untersuchten Antisense-Pflanzen zeigten hinsichtlich der Pflanzengröße deutliche Unterschiede auf. Es wurden Pflanzen gefunden, die die gleiche Größe hatten wie der Wildtyp, bis hin zu
- 20 ganz kleinen Pflanzen. Die nachfolgenden Generationen waren also nicht einheitlich. Dies gilt auch für die Reduktion in der DXPRI-Aktivität, die innerhalb einer Linie nicht einheitlich war, d.h. man kann eine Linie nicht durch eine spezifische Reduktion in der DXPRI-Aktivität definieren, sondern die Linien spalten auf (Sedo-
- 25 heptulose-1,7-Bisphosphatase-antisense-Tabak-Pflanzen weisen ein vergleichbares Phänomen auf; vgl. Harrison et al. 1998, Planta 204: 27-36).

- Die Biomassen-Analyse ergab eine Korrelation zwischen Reduktion
- 30 der DXPRI-Aktivität und Reduktion in der Biomasse.

#### Beispiel 6

#### Extraktion und Detektion von Tocopherol

35

#### Extraktionsverfahren:

- 100 mg Feuchtgewicht Blattmaterial
- Extraktionspuffer : 80 % Ethanol, 10 mM Hepes pH 7,0, 1 mM
- 40 Ascorbat
- Extraktion: 1:5 ( w/v)
- Inkubation bei 50°C, 30 Minuten
- Keine Zentrifugation
- Zugabe von ½ Volumen n-Hexan zu dem Extrakt
- 45 - Vortex und Zentrifugation (5 Minuten, Raumtemperatur )
- Gewinnung der oberen sehr grün gefärbten Phase
- Wiederholung der n-Hexan Extraktion mit der unteren Phase

## 21

- Vereinigung der n-Hexan Phasen
- Vakuum Trocknung ( 2-3 Stunden für 1 ml n-Hexan bei Raumtemperatur )
- Wiederauflösung des Rückstandes in ca. 1/5 des ursprünglichen n-Hexan Volumens
- 5 - Injektion von 30 - 50 µl auf die HPLC
- HPLC-Detektion für Tocopherol
- Detektion der Fluoreszenz: Anregung bei 295 nm, Emission bei 330 nm
- 10 - Säule: RP-18 ( Nucleosil 100, C18, 3µm, Fa. Knauer )
- Isokratisches System: n-Hexan plus 0,2 % 2-Propanol
- Fluß: 0,8 ml/min ( Druck: 110 bar )
- Standards von Sigma oder Merck
- Laufzeit: 15 Minuten

## 15

## Beispiel 7

Extraktion phenolischer Substanzen aus Blättern und HPLC-Analytik

- 20 Die Extraktion phenolischer Substanzen aus Blättern wurde wie bei Yao et al., The Plant Cell, 7 (1995), 1787 - beschrieben durchgeführt.

## Beispiel 8

## 25

## Herstellung von transgenen Tabakpflanzen

(Nicotiana tabacum L. cv. Samsun NN).

- 30 Für die Herstellung transgener Tabakpflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, wurden Tabakblattscheiben mit Sequenzen der DXPRI ( SEQ-ID No. 1), kloniert wie in Beispiel 4 beschrieben in den Transformationsvektor pBin19AR-TP, transformiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen wurden 10 ml einer
- 35 unter Selektion gewachsenen Übernachtskultur von Agrobacterium tumefaciens abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in gleichem Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakteriensuspension
- 40 gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, Physiol. Plant (1962) 15, 473) mit 2% Saccharose und 0.8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100mg/l Kanamycin, 500mg/l Claforan, 1mg/l Benzylaminopurin
- 45 (BAP), 0.2mg/l Naphtylelessigsäure (NAA), 1.6% Glukose und 0.8% Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf

hormonfreies MS-Medium mit 2% Saccharose, 250mg/l Claforan und 0.8% Bacto-Agar überführt.

#### Beispiel 9

5

#### Herstellung von transgenen Rapspflanzen (*Brassica napus*)

Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, orientierte sich an einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzungen der verwendeten Medien und Puffer angegeben sind.

15 Die Transformationen erfolgten mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBA4404 (Clontech GmbH, Heidelberg). Als binäre Vektoren wurden das bereits in Beispiel 4 beschriebene binäre Konstrukt mit der gesamten cDNA der DXPRI aus *Arabidopsis thaliana* ( SEQ-ID No.1 ) verwendet. In allen hier verwendeten binären Vektoren

20 wurde die NOS-Terminatorsequenz durch das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination ersetzt. *Brassica napus* Samen wurden mit 70% (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min bei 55°C in H<sub>2</sub>O gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v

25 Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H<sub>2</sub>O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glaskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices  
30 entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

35

Vom *Agrobacterium*-Stamm wurde eine Übernachtskultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der

40 Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0.3 eingestellt.

45 Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml *Agrobacterium*-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die *Agrobacterien*-



Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-  
5 Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten ent-  
10 fernt.

Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor  
15 verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in  
20 Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

#### Beispiel 10

25

#### Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Tabak

Die Überexpression der DXPRI aus *Arabidopsis thaliana* in Tabak erfolgte wie in Beispiel 8 beschrieben.

30

Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Tabakpflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Verg-  
35 leich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

#### Beispiel 11

#### Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

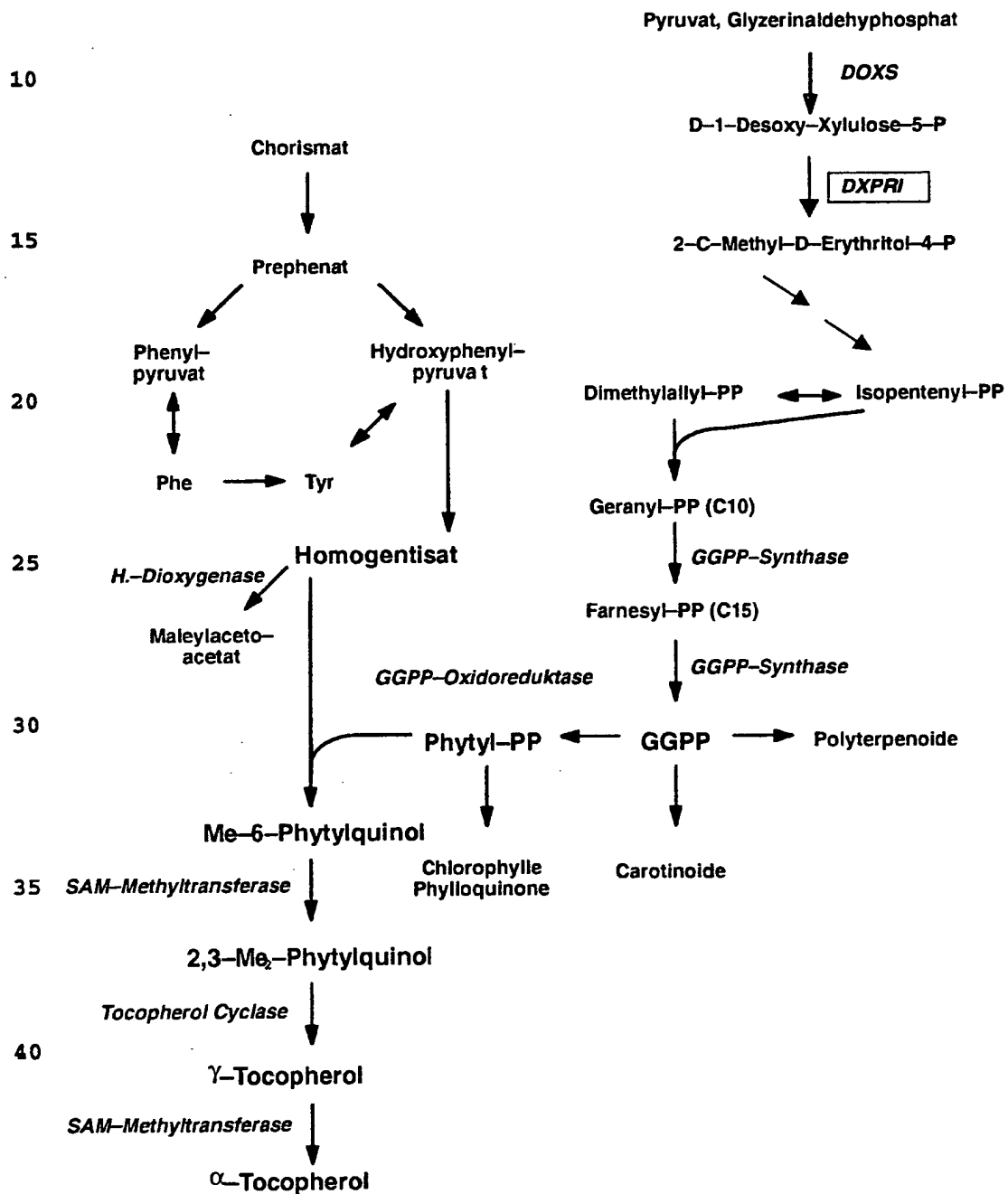
40

Die cDNA der DXPRI aus *Arabidopsis thaliana* ( SEQ-No.1 ) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseoligenes verwendet, um den Tocopherol-  
45 gehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt der Gesamtp-

flanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

## 5 Abbildung 1

Schematische Übersicht des Prenyllipidstoffwechsels



## Abbildung 2

Nukleotid-Sequenz der DXPRI aus *Arabidopsis thaliana*

5 GCGCCTCGTCAATCTTGGGATGGACCAAACCCATCTCTATCGTTGGATCTACTGGTTCATTGG  
 CACTCAGACATTGGATATTGTGGCTGAGAATCCTGACAAATTCAGAGTTGTGGCTCTAGCTGCTG  
 GTTCGAATGTTACTCTACTTGCCTGATCAGGTAAGGAGATTTAAGCCTGCATTGGTTGCTGTTAGA  
 AACGAGTCACATGATTAATGAGCTTAAAGAGGCTTTAGCTGATTTGGACTATAAACTCGAGATTAT  
 TCCAGGAGAGCAAGGAGTGATTGAGGTTGCCCCGACATCCCGAAGCTGTAACCGTTGTTACCGGAA  
 10 TAGTAGGTTGTGCGGGACTAAAGCCTACGGTTGCTGCAATTGAAGCAGGAAAGGACATTGCTCTT  
 GCAAACAAAGAGACATTAATCGCAGGTGGTCCTTTCGTGCTTCCGCTTGCCAACAAACATAATGT  
 AAAGATTCTTCCGGCAGATTCAGAACATTCGCCATATTTCAAGTGTATTCAAGGTTTGCCTGAAG  
 GCGCTCTGCGCAAGATAATCTTGACTGCATCTGGTGGAGCTTTTAGGGATTGGCCTGTGCGAAAAG  
 CTAAAGGAAGTTAAAGTAGCGGATGCGTTGAAGCATCCAAACTGGAACATGGGAAAGAAAATCAC  
 15 TGTGGACTCTGCTACGCTTTTCAACAAGGGTCTTGAGGTCATTGAAGCGCATTATTTGTTTGGAG  
 CTGAGTATGACGATATAGAGATTGTCATTTCATCCGCAAAGTATCATACATTCCATGATTGAAACA  
 CAGGATTCATCTGTGCTTGCTCAATTGGGTGGCCTGATATGCGTTTACCGATTCTCTACACCAT  
 GTCATGGCCCGATAGAGTTCCCTTGTTCTGAAGTAAGTTGGCCAAGACTTGACCTTTGCAAACCTCG  
 GTTCATTGACTTTTCAAGAAACCAGACAATGTGAAATACCCATCCATGGATCTTGCTTATGCTGCT  
 20 GGACGAGCTGGAGGCACAATGACTGGAGTTCTCAGCGCCGCCAATGAGAAAGCTGTTGAAATGTT  
 CATTGATGAAAAGATAAGCTATTTGGATATCTTCAAGGTTGTGGAATTAACATGCGATAAACATC  
 GAAACGAGTTGGTAACATCACCGTCTCTTGAAGAGATTGTTCACTATGACTTGTGGGCACGTGAA  
 TATGCCGCGAATGTGCAGCTTTCTTCTGGTGCTAGGCCAGTTCATGCATGA

25

## Abbildung 3

Nukleotid-Sequenz der DXPRI aus *Arabidopsis thaliana* als Fusions-  
sequenz

30

1 ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCCGGATCCGGCGCCTCG  
 51 TCAATCTTGGGATGGACCAAACCCATCTCTATCGTTGGATCTACTGGTT  
 101 CTATTGGCACTCAGACATTGGATATTGTGGCTGAGAATCCTGACAAATTC  
 151 AGAGTTGTGGCTCTAGCTGCTGGTTCGAATGTTACTCTACTTGCTGATCA  
 35 201 GGTAAGGAGATTTAAGCCTGCATTGGTTGCTGTTAGAAACGAGTCACTGA  
 251 TTAATGAGCTTAAAGAGGCTTTAGCTGATTTGGACTATAAACTCGAGATT  
 301 ATTCAGGAGAGCAAGGAGTGATTGAGGTTGCCCCGACATCCCGAAGCTGT  
 351 AACCGTTGTTACCGGAATAGTAGGTTGTGCGGGACTAAAGCCTACGGTTG  
 401 CTGCAATTGAAGCAGGAAAGGACATTGCTCTTGCAAACAAAGAGACATTA  
 40 451 ATCGCAGGTGGTCCCTTTTCGTGCTTCCGCTTGCCAACAAACATAATGTAAA  
 501 GATTCTTCCGGCAGATTCAGAACATTCGCCATATTTCAAGTGTATTCAAG  
 551 GTTTGCCTGAAGGCGCTCTGCGCAAGATAATCTTGACTGCATCTGGTGGAA  
 601 GCTTTTAGGGATTGGCCTGTGCGAAAAGCTAAAGGAAGTTAAAGTAGCGGA  
 651 TGCGTTGAAGCATCCAAACTGGAACATGGGAAAGAAAATCACTGTGGACT  
 45 701 CTGCTACGCTTTTCAACAAGGGTCTTGAGGTCATTGAAGCGCATTATTTG  
 751 TTTGGAGCTGAGTATGACGATATAGAGATTGTCATTTCATCCGCAAAGTAT  
 801 CATACATTCCATGATTGAAACACAGGATTCATCTGTGCTTGCTCAATTGG

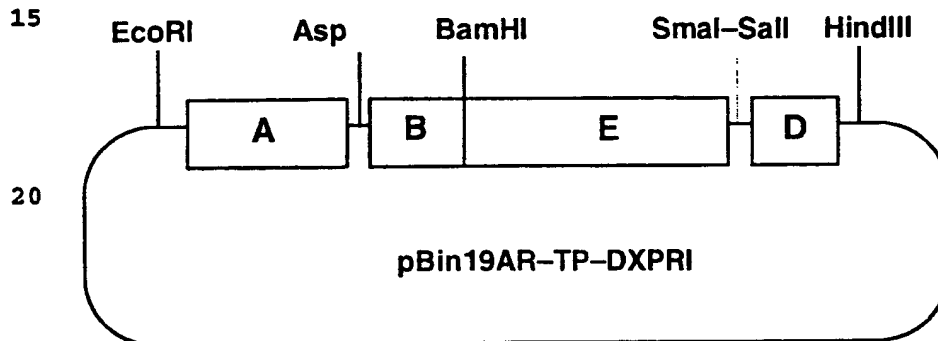
851 GTTGGCCTGATATGCGTTTACCGATTCTCTACACCATGTCATGGCCCCGAT  
 901 AGAGTTCCTTGTCTGAAGTAACTTGGCCAAGACTTGACCTTTGCAAAC  
 951 CGGTTTCATTGACTTTCAAGAAACCAGACAATGTGAAATACCCATCCATGG  
 1001 ATCTTGCTTATGCTGCTGGACGAGCTGGAGGCACAATGACTGGAGTTCTC  
 5 1051 AGCGCCGCCAATGAGAAAGCTGTTGAAATGTTTCATTGATGAAAAGATAAG  
 1101 CTATTTGGATATCTTCAAGGTTGTGGAATTAACATGCGATAAACATCGAA  
 1151 ACGAGTTGGTAACATCACCGTCTCTTGAAGAGATTGTTCACTATGACTTG  
 1201 TGGGCACGTGAATATGCCGCGAATGTGCAGCTTTCTTCTGGTGCTAGGCC  
 1251 AGTTCATGCATGAAGAATTGGTTGTTGGAAGAAGAATTC

10

Abbildung 4

Binärer Vektor zur Überexpression des DXPRI-Gens aus *Arabidopsis thaliana* im Plastiden transgener Pflanzen

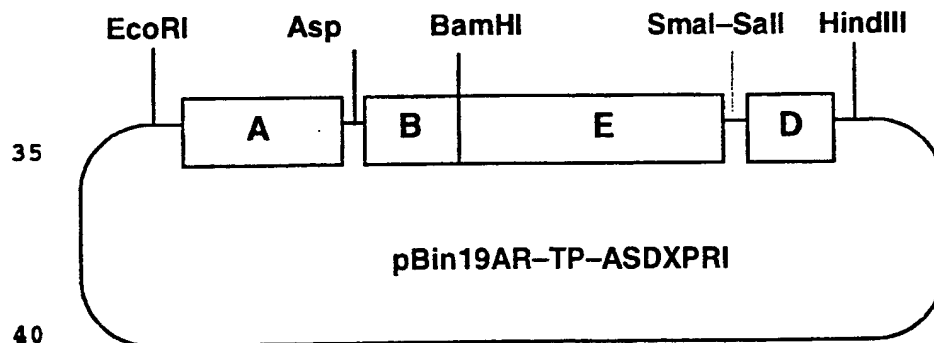
15



25

Abbildung 5

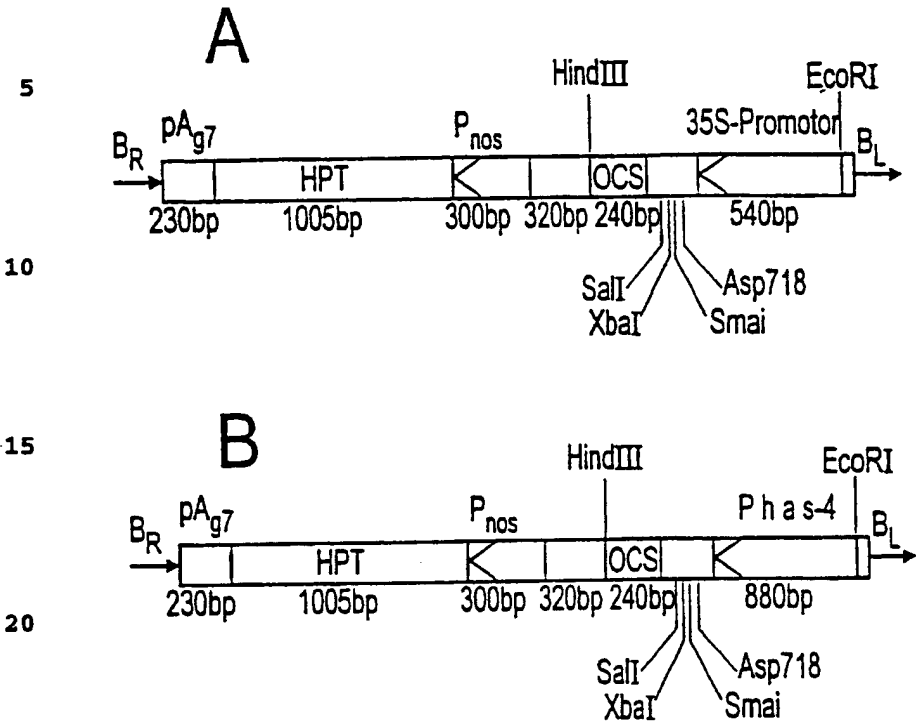
Binärer Vektor zur Antisense-Expression des DXPRI-Gens aus *Arabi-*  
 30 *dopsis thaliana* im Plastiden transgener Pflanzen



40

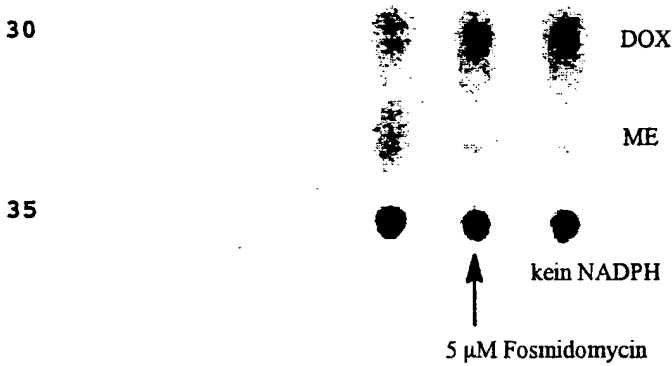
45

Abbildung 6



25 Abbildung 7

Nachweis der Hemmbarkeit mit Fosmidomycin und Cofaktorbedarf der DXPRI:



## Abbildung 8

Einfluß von Fosmidomycin auf die Neubildung von Pigmenten in etioliierten Gerstenkeimlingen

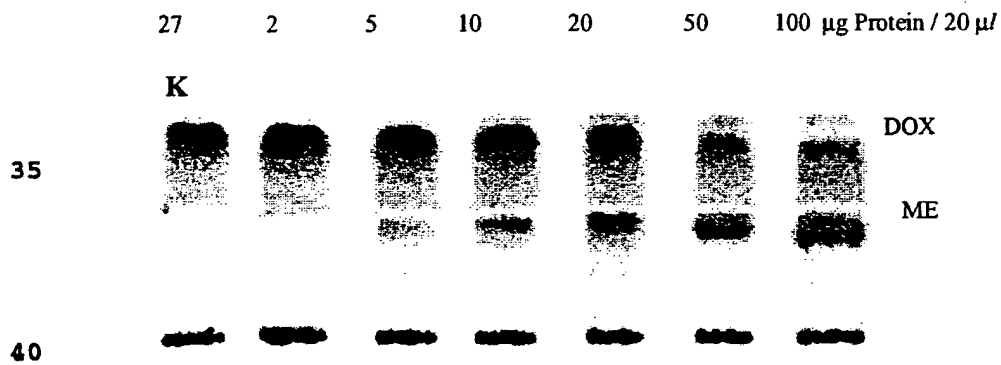
5

10		Chlorophylle		Carotinoide		Pigment-Verhält-	
		$\mu\text{g} / \text{g TG}$		$\mu\text{g} / \text{g TG}$		nisse	
		bzw. Hemmung		bzw. Hemmung		a	(a+b)
		in %		in %		b	(x+c)
15	Kontrolle	4361	(0 %)	603	(0 %)	3.65	7.2
	Fosmido- mycin						
20	$10^{-6} \text{ M}$	4201	(4 %)	552	(8 %)	3.59	7.6
	$10^{-5} \text{ M}$	2747	(37 %)	179	(70 %)	4.74	15.3
	$10^{-4} \text{ M}$	428	(91 %)	0	(100 %)	12.32	$\infty$

## 25 Abbildung 9

Heterologe Expression der DXPRI aus *Arabidopsis thaliana* in *E. coli*

30



45

## Patentansprüche

1. DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 und damit hybridisierende DNA-Se-  
5 quenzen kodierend für eine pflanzliche 1-Desoxy-D-Xylu-  
lose-5-Phosphat Reduktoisomerase.
2. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Desoxy-  
D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase zur Herstellung von  
10 Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K,  
Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen.
3. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder einer mit die-  
ser hybridisierenden DNA-Sequenz kodierend für eine 1-Desoxy-  
15 D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase zur Herstellung von  
Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K,  
Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen.
4. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an  
20 Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und  
Polyterpenen, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz  
SEQ-ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA-Se-  
quenz in Pflanzen exprimiert wird.
- 25 5. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekenn-  
zeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen  
Promotor und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine mit die-  
ser hybridisierende DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, in  
Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflan-  
30 zenzellen einbringt.
6. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des  
Stammes *Agrobacterium tumefaciens*, der Elektroporation oder  
35 der particle bombardment Methode erfolgt.
7. Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K,  
Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen enthaltend eine  
Expressionskassette gemäß Anspruch 5.  
40
8. Pflanze nach Anspruch 7, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Ca-  
nola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.

Überexpression einer DNA-Sequenz codierend für eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase in Pflanzen

## 5 Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen durch Überexpression eines DXPRI-Gens.

10

15

20

25

30

35

40

45



## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF AG

<120> Ueberexpression einer DNA-Sequenz codierend fuer eine  
1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase in  
Pflanzen

&lt;130&gt; 990380

&lt;140&gt; 0050-49943

&lt;141&gt; 1999-04-27

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Vers. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1221

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1221)

&lt;400&gt; 1

gcg cct cgt caa tct tgg gat gga cca aaa ccc atc tct atc gtt gga	48
Ala Pro Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly	
1 5 10 15	
tct act ggt tct att ggc act cag aca ttg gat att gtg gct gag aat	96
Ser Thr Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn	
20 25 30	
cct gac aaa ttc aga gtt gtg gct cta gct gct ggt tcg aat gtt act	144
Pro Asp Lys Phe Arg Val Val Ala Leu Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr	
35 40 45	
cta ctt gct gat cag gta agg aga ttt aag cct gca ttg gtt gct gtt	192
Leu Leu Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe Lys Pro Ala Leu Val Ala Val	
50 55 60	
aga aac gag tca ctg att aat gag ctt aaa gag gct tta gct gat ttg	240
Arg Asn Glu Ser Leu Ile Asn Glu Leu Lys Glu Ala Leu Ala Asp Leu	
65 70 75 80	
gac tat aaa ctc gag att att cca gga gag caa gga gtg att gag gtt	288
Asp Tyr Lys Leu Glu Ile Ile Pro Gly Glu Gln Gly Val Ile Glu Val	

85	90	95	
gcc cga cat ccc gaa gct gta acc gtt gtt acc gga ata gta ggt tgt			336
Ala Arg His Pro Glu Ala Val Thr Val Val Thr Gly Ile Val Gly Cys			
100	105	110	
gcg gga cta aag cct acg gtt gct gca att gaa gca gga aag gac att			384
Ala Gly Leu Lys Pro Thr Val Ala Ala Ile Glu Ala Gly Lys Asp Ile			
115	120	125	
gct ctt gca aac aaa gag aca tta atc gca ggt ggt cct ttc gtg ctt			432
Ala Leu Ala Asn Lys Glu Thr Leu Ile Ala Gly Gly Pro Phe Val Leu			
130	135	140	
ccg ctt gcc aac aaa cat aat gta aag att ctt ccg gca gat tca gaa			480
Pro Leu Ala Asn Lys His Asn Val Lys Ile Leu Pro Ala Asp Ser Glu			
145	150	155	160
cat tct gcc ata ttt cag tgt att caa ggt ttg cct gaa ggc gct ctg			528
His Ser Ala Ile Phe Gln Cys Ile Gln Gly Leu Pro Glu Gly Ala Leu			
165	170	175	
cgc aag ata atc ttg act gca tct ggt gga gct ttt agg gat tgg cct			576
Arg Lys Ile Ile Leu Thr Ala Ser Gly Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro			
180	185	190	
gtc gaa aag cta aag gaa gtt aaa gta gcg gat gcg ttg aag cat cca			624
Val Glu Lys Leu Lys Glu Val Lys Val Ala Asp Ala Leu Lys His Pro			
195	200	205	
aac tgg aac atg gga aag aaa atc act gtg gac tct gct acg ctt ttc			672
Asn Trp Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe			
210	215	220	
aac aag ggt ctt gag gtc att gaa gcg cat tat ttg ttt gga gct gag			720
Asn Lys Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu			
225	230	235	240
tat gac gat ata gag att gtc att cat ccg caa agt atc ata cat tcc			768
Tyr Asp Asp Ile Glu Ile Val Ile His Pro Gln Ser Ile Ile His Ser			
245	250	255	
atg att gaa aca cag gat tca tct gtg ctt gct caa ttg ggt tgg cct			816
Met Ile Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro			
260	265	270	
gat atg cgt tta ccg att ctc tac acc atg tca tgg ccc gat aga gtt			864
Asp Met Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr Met Ser Trp Pro Asp Arg Val			
275	280	285	

```

cct tgt tct gaa gta act tgg cca aga ctt gac ctt tgc aaa ctc ggt 912
Pro Cys Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly
290 295 300

tca ttg act ttc aag aaa cca gac aat gtg aaa tac cca tcc atg gat 960
Ser Leu Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp
305 310 315 320

ctt gct tat gct gct gga cga gct gga ggc aca atg act gga gtt ctc 1008
Leu Ala Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly Gly Thr Met Thr Gly Val Leu
325 330 335

agc gcc gcc aat gag aaa gct gtt gaa atg ttc att gat gaa aag ata 1056
Ser Ala Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile
340 345 350

agc tat ttg gat atc ttc aag gtt gtg gaa tta aca tgc gat aaa cat 1104
Ser Tyr Leu Asp Ile Phe Lys Val Val Glu Leu Thr Cys Asp Lys His
355 360 365

cga aac gag ttg gta aca tca ccg tct ctt gaa gag att gtt cac tat 1152
Arg Asn Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser Leu Glu Glu Ile Val His Tyr
370 375 380

gac ttg tgg gca cgt gaa tat gcc gcg aat gtg cag ctt tct tct ggt 1200
Asp Leu Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly
385 390 395 400

gct agg cca gtt cat gca tga 1221
Ala Arg Pro Val His Ala
405

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 406

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 2

```

Ala Pro Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly
1 5 10 15

```

```

Ser Thr Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn
20 25 30

```

```

Pro Asp Lys Phe Arg Val Val Ala Leu Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr
35 40 45

```

Leu Leu Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe Lys Pro Ala Leu Val Ala Val  
 50 55 60

Arg Asn Glu Ser Leu Ile Asn Glu Leu Lys Glu Ala Leu Ala Asp Leu  
 65 70 75 80

Asp Tyr Lys Leu Glu Ile Ile Pro Gly Glu Gln Gly Val Ile Glu Val  
 85 90 95

Ala Arg His Pro Glu Ala Val Thr Val Val Thr Gly Ile Val Gly Cys  
 100 105 110

Ala Gly Leu Lys Pro Thr Val Ala Ala Ile Glu Ala Gly Lys Asp Ile  
 115 120 125

Ala Leu Ala Asn Lys Glu Thr Leu Ile Ala Gly Gly Pro Phe Val Leu  
 130 135 140

Pro Leu Ala Asn Lys His Asn Val Lys Ile Leu Pro Ala Asp Ser Glu  
 145 150 155 160

His Ser Ala Ile Phe Gln Cys Ile Gln Gly Leu Pro Glu Gly Ala Leu  
 165 170 175

Arg Lys Ile Ile Leu Thr Ala Ser Gly Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro  
 180 185 190

Val Glu Lys Leu Lys Glu Val Lys Val Ala Asp Ala Leu Lys His Pro  
 195 200 205

Asn Trp Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe  
 210 215 220

Asn Lys Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu  
 225 230 235 240

Tyr Asp Asp Ile Glu Ile Val Ile His Pro Gln Ser Ile Ile His Ser  
 245 250 255

Met Ile Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro  
 260 265 270

Asp Met Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr Met Ser Trp Pro Asp Arg Val  
 275 280 285

Pro Cys Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly  
 290 295 300

Ser Leu Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp

305                                      310                                      315                                      320  
 Leu Ala Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly Gly Thr Met Thr Gly Val Leu  
    325                                      330                                      335  
 Ser Ala Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile  
    340                                      345                                      350  
 Ser Tyr Leu Asp Ile Phe Lys Val Val Glu Leu Thr Cys Asp Lys His  
    355                                      360                                      365  
 Arg Asn Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser Leu Glu Glu Ile Val His Tyr  
    370                                      375                                      380  
 Asp Leu Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly  
 385                                      390                                      395                                      400  
 Ala Arg Pro Val His Ala  
    405

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1289

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1263)

&lt;400&gt; 3

atg gct agc atg act ggt gga cag caa atg ggt cgg gat ccg gcg cct      48  
 Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Pro Ala Pro  
     1                                      5                                      10                                      15  
 cgt caa tct tgg gat gga cca aaa ccc atc tct atc gtt gga tct act      96  
 Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly Ser Thr  
    20                                      25                                      30  
 ggt tct att ggc act cag aca ttg gat att gtg gct gag aat cct gac      144  
 Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn Pro Asp  
    35                                      40                                      45  
 aaa ttc aga gtt gtg gct cta gct gct ggt tcg aat gtt act cta ctt      192  
 Lys Phe Arg Val Val Ala Leu Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr Leu Leu  
    50                                      55                                      60  
 gct gat cag gta agg aga ttt aag cct gca ttg gtt gct gtt aga aac      240  
 Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe Lys Pro Ala Leu Val Ala Val Arg Asn

65	70	75	80	
gag tca ctg att aat gag ctt aaa gag gct tta gct gat ttg gac tat				288
Glu Ser Leu Ile Asn Glu Leu Lys Glu Ala Leu Ala Asp Leu Asp Tyr				
	85	90	95	
aaa ctc gag att att cca gga gag caa gga gtg att gag gtt gcc cga				336
Lys Leu Glu Ile Ile Pro Gly Glu Gln Gly Val Ile Glu Val Ala Arg				
	100	105	110	
cat ccc gaa gct gta acc gtt gtt acc gga ata gta ggt tgt gcg gga				384
His Pro Glu Ala Val Thr Val Val Thr Gly Ile Val Gly Cys Ala Gly				
	115	120	125	
cta aag cct acg gtt gct gca att gaa gca gga aag gac att gct ctt				432
Leu Lys Pro Thr Val Ala Ala Ile Glu Ala Gly Lys Asp Ile Ala Leu				
	130	135	140	
gca aac aaa gag aca tta atc gca ggt ggt cct ttc gtg ctt ccg ctt				480
Ala Asn Lys Glu Thr Leu Ile Ala Gly Gly Pro Phe Val Leu Pro Leu				
	145	150	155	160
gcc aac aaa cat aat gta aag att ctt ccg gca gat tca gaa cat tct				528
Ala Asn Lys His Asn Val Lys Ile Leu Pro Ala Asp Ser Glu His Ser				
	165	170	175	
gcc ata ttt cag tgt att caa ggt ttg cct gaa ggc gct ctg cgc aag				576
Ala Ile Phe Gln Cys Ile Gln Gly Leu Pro Glu Gly Ala Leu Arg Lys				
	180	185	190	
ata atc ttg act gca tct ggt gga gct ttt agg gat tgg cct gtc gaa				624
Ile Ile Leu Thr Ala Ser Gly Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro Val Glu				
	195	200	205	
aag cta aag gaa gtt aaa gta gcg gat gcg ttg aag cat cca aac tgg				672
Lys Leu Lys Glu Val Lys Val Ala Asp Ala Leu Lys His Pro Asn Trp				
	210	215	220	
aac atg gga aag aaa atc act gtg gac tct gct acg ctt ttc aac aag				720
Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe Asn Lys				
	225	230	235	240
ggt ctt gag gtc att gaa gcg cat tat ttg ttt gga gct gag tat gac				768
Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu Tyr Asp				
	245	250	255	
gat ata gag att gtc att cat ccg caa agt atc ata cat tcc atg att				816
Asp Ile Glu Ile Val Ile His Pro Gln Ser Ile Ile His Ser Met Ile				
	260	265	270	

gaa aca cag gat tca tct gtg ctt gct caa ttg ggt tgg cct gat atg . 864  
 Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro Asp Met  
 275 280 285

cgt tta ccg att ctc tac acc atg tca tgg ccc gat aga gtt cct tgt 912  
 Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr Met Ser Trp Pro Asp Arg Val Pro Cys  
 290 295 300

tct gaa gta act tgg cca aga ctt gac ctt tgc aaa ctc ggt tca ttg 960  
 Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly Ser Leu  
 305 310 315 320

act ttc aag aaa cca gac aat gtg aaa tac cca tcc atg gat ctt gct 1008  
 Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp Leu Ala  
 325 330 335

tat gct gct gga cga gct gga ggc aca atg act gga gtt ctc agc gcc 1056  
 Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly Gly Thr Met Thr Gly Val Leu Ser Ala  
 340 345 350

gcc aat gag aaa gct gtt gaa atg ttc att gat gaa aag ata agc tat 1104  
 Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile Ser Tyr  
 355 360 365

ttg gat atc ttc aag gtt gtg gaa tta aca tgc gat aaa cat cga aac 1152  
 Leu Asp Ile Phe Lys Val Val Glu Leu Thr Cys Asp Lys His Arg Asn  
 370 375 380

gag ttg gta aca tca ccg tct ctt gaa gag att gtt cac tat gac ttg 1200  
 Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser Leu Glu Glu Ile Val His Tyr Asp Leu  
 385 390 395 400

tgg gca cgt gaa tat gcc gcg aat gtg cag ctt tct tct ggt gct agg 1248  
 Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly Ala Arg  
 405 410 415

cca gtt cat gca tga agaattgggtt gttggaagaa gaattc 1289  
 Pro Val His Ala  
 420

<210> 4  
 <211> 420  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 4  
 Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Pro Ala Pro

1	5	10	15
Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly Ser Thr	20	25	30
Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn Pro Asp	35	40	45
Lys Phe Arg Val Val Ala Leu Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr Leu Leu	50	55	60
Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe Lys Pro Ala Leu Val Ala Val Arg Asn	65	70	75
Glu Ser Leu Ile Asn Glu Leu Lys Glu Ala Leu Ala Asp Leu Asp Tyr	85	90	95
Lys Leu Glu Ile Ile Pro Gly Glu Gln Gly Val Ile Glu Val Ala Arg	100	105	110
His Pro Glu Ala Val Thr Val Val Thr Gly Ile Val Gly Cys Ala Gly	115	120	125
Leu Lys Pro Thr Val Ala Ala Ile Glu Ala Gly Lys Asp Ile Ala Leu	130	135	140
Ala Asn Lys Glu Thr Leu Ile Ala Gly Gly Pro Phe Val Leu Pro Leu	145	150	155
Ala Asn Lys His Asn Val Lys Ile Leu Pro Ala Asp Ser Glu His Ser	165	170	175
Ala Ile Phe Gln Cys Ile Gln Gly Leu Pro Glu Gly Ala Leu Arg Lys	180	185	190
Ile Ile Leu Thr Ala Ser Gly Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro Val Glu	195	200	205
Lys Leu Lys Glu Val Lys Val Ala Asp Ala Leu Lys His Pro Asn Trp	210	215	220
Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe Asn Lys	225	230	235
Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu Tyr Asp	245	250	255
Asp Ile Glu Ile Val Ile His Pro Gln Ser Ile Ile His Ser Met Ile	260	265	270



Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro Asp Met  
275 280 285

Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr Met Ser Trp Pro Asp Arg Val Pro Cys  
290 295 300

Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly Ser Leu  
305 310 315 320

Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp Leu Ala  
325 330 335

Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly Gly Thr Met Thr Gly Val Leu Ser Ala  
340 345 350

Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile Ser Tyr  
355 360 365

Leu Asp Ile Phe Lys Val Val Glu Leu Thr Cys Asp Lys His Arg Asn  
370 375 380

Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser Leu Glu Glu Ile Val His Tyr Asp Leu  
385 390 395 400

Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly Ala Arg  
405 410 415

Pro Val His Ala  
420